FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
CD45, Leucocyte Common Antigen
Clones 2B11 + PD7/26
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS751

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD45, Leucocyte Common Antigen, Clones 2B11 + PD7/26, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with (Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody labels CD45 in both normal and neoplastic cells, and is useful for identifying tumor cells of lymphoid origin (1-3). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Synonym for antigen

T200 (4), Ly-5 (5).

Summary and explanation

CD45 is a transmembrane glycoprotein expressed on most nucleated cells of haematopoietic origin. CD45, encoded by a single gene mapped to chromosome 1, has various isoforms based on differential splicing of exons 4, 5 and 6. On human leucocytes, five different isoforms of CD45, named ABC, AB, BC, B and 0, have been identified. These isoforms are recognized by CD45RA, CD45RB, CD45RC and CD45R0 antibodies. The isoforms range in Mr from 180000 to 220000. All the CD45 isoforms share the same intracellular segment, which has been shown to have tyrosine phosphatase activity. Various leucocytes express characteristic CD45 isoforms, thus T cells express CD45 isoforms corresponding to their development and activation, B cells predominantly express the ABC isoform, and monocytes and dendritic cells predominantly express the B and 0 isoforms. Granulocytes principally express only the B and 0 isoforms (4).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Clone: 2B11 (1) and PD7/26 (1). Isotype: IgG1, kappa.

Immunogen

2B11: Isolated neoplastic cells from a case of T-cell lymphoma/leukemia (1).

PD7/26: Human peripheral blood lymphocytes maintained in T-cell growth factor (1).

Specificity

Anti-CD45 is a mixture of two monoclonal antibodies, clones 2B11 and PD7/26, directed against different epitopes. Clone 2B11 was clustered as anti-CD45 at the Third International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens and reacts with all the known isotypes of the CD45 family (6). Clone PD7/26 was clustered as anti-CD45RB at the Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (7).

Precautions

1. For professional users.

2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.

3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.

5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 ℃. Do not use after expiration date sta mped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004).

Paraffin-embedded sections: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004). Note: After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using aqueous or permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 µL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 µL dispense volume)

Autoprogram: CD45LCA (without counterstaining) or CD45LCAH (with counterstaining)

The Auxiliary step should be set to "rinse buffer" in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to "none". This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer instrument, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in "Performance characteristics".

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include tonsil and brain and the cells/structures should display reaction patterns as described for these tissues in "Performance characteristics" in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation

Cells labeled by the antibody display membrane staining, but cytoplasmic staining may also occur.

Performance characteristics

Normal tissues: In tonsil, the antibody labels germinal centres, follicular mantle zones, and interfollicular regions (1). In spleen, white pulp and lymphoid cells of red pulp are positive, as also thymic lymphocytes, bone marrow lymphoid cells, mast cells, cells of probable monocytic derivation, and occasional plasma cells. Variable labeling of immunoblasts, epithelioid histiocytes, sinus histiocytes and plasma cells has been reported. Myeloid cells, erythroid cells, megakaryocytes, Langerhans cells in skin, epithelium, and connective tissue are not labeled by the antibody (2). B and T cells in tonsil show a moderate to strong staining reaction, whereas microglial cells in the brain show a weak to moderate staining reaction.

Abnormal tissues: In non-Hodgkin's lymphoma, the neoplastic cells were labeled by the antibody in 40/40 (100%) of cases (1). In another study (2) the figure was 74/80 (93%). A third study (8) showed that 52/52 (100%) low grade B-cell lymphomas, 99/108 (92%) high grade B-cell lymphomas, and 41/44 (93%) T-cell lymphomas were positive with the antibody. Altogether 162/162 (100%) non-lymphoid neoplasms were negative with the antibody, including small cell anaplastic carcinomas, amelanotic melanomas, alveolar rhabdomyosarcomas, Ewing's sarcoma, and germ cell tumors (1, 2). Labeling of the surface membrane of mammary ductal cells in specimens of fibrocystic disease and fibroadenoma has been reported for the antibody. This expression, however, is not considered to present a differential diagnostic problem that might lead to misidentification (9)

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique *in vitro*.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD45, Leucocyte Common Antigen, clones 2B11 + PD7/26, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments (Dako Autostainer/Autostainer Plus). Cet anticorps marque la CD45 à la fois dans les cellules normales et néoplasiques, et il est utile pour identifier les cellules tumorales d'origine lymphoïde (1-3). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Synonyme de l'antigène

T200 (4), Ly-5 (5).

Résumé et explication

La CD45 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée sur la plupart des cellules nucléées d'origine hématopoïétique. La CD45, codée par un seul gène localisé sur le chromosome 1, possède plusieurs isoformes selon l'épissage différentiel des exons 4, 5 et 6. Sur les leucocytes humains, cinq isoformes différents de la CD45, appelés ABC, AB, BC, B et 0, ont été identifiés. Ces isoformes sont reconnus par les anticorps dirigés contre la CD45RA, la CD45RB, la CD45RC et la CD45R0. Les isoformes ont un poids moléculaire compris entre 180 000 et 220 000. Tous les isoformes de la CD45 partagent le même segment intracellulaire, qui possède une activité tyrosine phosphatase. Les divers leucocytes expriment des isoformes caractéristiques de la CD45. Ainsi, les lymphocytes T expriment des isoformes de la CD45 correspondant à leur développement et à leur activation, les lymphocytes B expriment de manière prédominante l'isoforme ABC, et les monocytes et cellules dendritiques expriment de manière prédominante les isoformes B et 0. Les granulocytes expriment principalement et uniquement les isoformes B et 0 (4).

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : 2B11 (1) et PD7/26 (1). Isotype : IgG_1, kappa

Immunogène

2B11 : Cellules néoplasiques isolées à partir d'un cas de lymphome/leucémie à lymphocytes T (1).

PD7/26 : Lymphocytes de sang périphérique humain conservés sur le facteur de croissance des lymphocytes T (1).

Spécificité

L'anti-CD45 est un mélange de deux anticorps monoclonaux, clones 2B11 et PD7/26, dirigés contre différents épitopes. Le clone 2B11 a été classé comme un anti-CD45 lors de la Third International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Troisième Conférence et Atelier Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains (HLDA)) et réagit à tous les isotypes connus de la famille du CD45 (6). Le clone PD7/26 a été classé comme un anti-CD45RB lors de la Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Cinquième Conférence et Atelier Internationaux sur les Antigènes de Différenciation des Leucocytes Humains (HLDA)) (7).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.

2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.

3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.

4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.

5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Un prétraitement avec démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire avec le Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004).

Coupes incluses en paraffine : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure de préparation d'échantillon 3-en-un pour le Dako PT Link. Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004). Remarque : après coloration, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Coupes déparaffinées : le prétraitement des coupes tissulaires déparaffinées, fixées au formol et incluses en paraffine, est recommandé à l'aide du Dako PT Link, en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames FLEX IHC Microscope Slides (Réf. K8020).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume de distribution de 200 µL) ou FLEXRTU3 (volume de distribution de 300 µL)

Autoprogram : CD45LCA (sans contre-coloration) ou CD45LCAH (avec contre-coloration)

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec ≤10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela confirme des temps de lavage comparables.

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Dako Autostainer utilisé, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide d'hématoxyline EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Les tissus de contrôle positifs doivent comprendre les amygdales et le cerveau et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » dans tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS750).

Interprétation de la coloration

Les cellules marquées par l'anticorps présentent une coloration membranaire mais une coloration cytoplasmique peut également se produire.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : Dans l'amygdale, l'anticorps marque les centres germinatifs, les zones du manteau folliculaire et les régions interfolliculaires (1). Dans la rate, la pulpe blanche et les cellules lymphoïdes de la pulpe rouge sont positives, ainsi que les lymphocytes thymiques, les lymphocytes de la moelle osseuse, les mastocytes, les cellules de dérivation monocytaire probables et les plasmocytes occasionnels. Un marquage variable des immunoblastes, des histiocytes épithélioïdes, des histiocytes sinusaux et des plasmocytes a été observé. Les cellules myéloïdes, les cellules érythroïdes, les mégacaryocytes, les cellules de Langerhans de la peau, de l'épithélium, et du tissu conjonctif ne sont pas marqués par l'anticorps (2). Les lymphocytes B et T dans les amygdales ont présenté une coloration modérée à forte, tandis que la coloration des cellules microgliales du cerveau était faible à modérée.

Tissus tumoraux : Dans le cas du lymphome non hodgkinien, les cellules néoplasiques ont été marquées par l'anticorps dans 40/40 des cas (100 %) (1). Dans une autre étude (2) le chiffre était de 74/80 (93 %). Une troisième étude (8) a montré que 52/52 (100 %) des lymphomes à lymphocytes B de faible grade, 99/108 (92 %) des lymphomes à lymphocytes B de grade élevé et 41/44 (93 %) des lymphomes à lymphocytes T étaient marqués positivement par l'anticorps. Dans l'ensemble, 162/162 (100 %) des néoplasmes non lymphoïdes étaient négatifs à l'anticorps, y compris les carcinomes anaplasiques à petites cellules, les mélanomes non mélaniques, les rhabdomyosarcomes alvéolaires, le sarcome d'Ewing et les tumeurs des cellules germinales (1, 2). Un marquage par l'anticorps de la membrane de surface des cellules canalaires de la glande mammaire dans les échantillons de fibroadénome et de maladie fibrokystique a été observé. Cette expression, cependant, n'est pas considérée comme présentant un problème de diagnostic différentiel susceptible d'entraîner une identification erronée (9).

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human CD45, Leucocyte Common Antigen, Clones 2B11 + PD7/26, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper markiert CD45 sowohl in gesunden als auch in neoplastischen Zellen und dient zur Identifizierung von Tumorzellen lymphoiden Ursprungs (1–3). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Synonym für das Antigen

T200 (4), Ly-5 (5).

Zusammenfassung und Erklärung

CD45 ist ein Transmembran-Glykoprotein, das auf den meisten nukleierten Zellen hämatopoietischen Ursprungs exprimiert wird. Von CD45, das von einem einzigen, auf Chromosom 1 befindlichen Gen kodiert wird, wurden aufgrund unterschiedlicher Splicing-Vorgänge der Exonen 4, 5 und 6 fünf verschiedene Isoformen, ABC, AB, BC, B und 0, identifiziert. Diese Isoformen werden von Antikörpern gegen CD45RA, CD45RB, CD45RC und CD45R0 nachgewiesen. Das Mr der Isoformen liegt zwischen 180 000 und 220 000. Allen CD45-Isoformen gemeinsam ist das intrazelluläre Segment, das nachweislich eine Tyrosinphosphatase-Aktivität aufweist. Verschiedene Leukozyten exprimieren charakteristische CD45-Isoformen, weswegen T-Zellen CD45-Isoformen exprimieren, die ihrer Entwicklung und Aktivierung entsprechen, B-Zellen vorwiegend die ABC-Isoform exprimieren und Monozyten und dendritische Retikulumzellen vorwiegend die B- und 0-Isoformen exprimieren. Granulozyten exprimieren prinzipiell nur die B- und 0-Isoformen (4).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L Natriumazid enthält.

Klon: 2B11 (1) und PD7/26 (1). Isotyp: IgG1, Kappa

Immunogen

2B11: Isolierte neoplastische Zellen aus einem Fall von T-Zellen-Lymphom/Leukämie (1).

PD7/26: Menschliche Lymphozyten aus peripherem Blut, in T-Zell-Wachstumsfaktor erhalten (1).

Spezifität

Anti-CD45 ist eine Mischung aus zwei monoklonalen Antikörpern, Klon 2B11 und PD7/26, zum Nachweis unterschiedlicher Epitope. Klon 2B11 wurde bei dem/der Third International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (3. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) als Anti-CD45 geclustert und reagiert mit allen bekannten Isotypen der CD45-Familie (6). Klon PD7/26 wurde bei dem/der Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5. Internationale(r) Workshop und Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene) als Anti-CD45RB geclustert (7).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.

2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.

3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.

4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.

5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Aufbewahrung

Bei 2–8 ℃ aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschch en aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) ist erforderlich. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) erzielt werden.

Paraffineingebettete Schnitte: Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte mit dem 3-in-1-Probenvorbereitungsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) durchführen. Hinweis: Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit permanentem Einbettmedium auf den Objektträger aufgebracht werden.

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Entparaffinierte Schnitte: Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Die Objektträger nach dem Färben mit einem wässrigen oder permanenten Einbettmedium bedecken.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX+, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrixprotokoll: FLEXRTU2 (200 µL Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µL Abgabevolumen)

Autoprogram: CD45LCA (ohne Gegenfärbung) oder CD45LCAH (mit Gegenfärbung)

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz"-Schritt auf „Pufferspülgang" eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz"-Schritt auf „Keine" einstellen. Dieses gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe sollte Mandelgewebe und Hirn enthalten und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

Auswertung der Färbung

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen eine Membranfärbung auf, es kann jedoch auch eine zytoplasmatische Färbung auftreten.

Leistungsmerkmale

Gesundes Gewebe: In Mandelgewebe markiert der Antikörper Keimzentren, follikuläre Mantelzonen und interfollikuläre Regionen (1). In der Milz sind die weiße Pulpa und lymphoide Zellen der roten Pulpa sowie Thymuslymphozyten, lymphoide Zellen des Knochenmarks, Mastzellen, Zellen von wahrscheinlich monozytischer Abstammung und gelegentlich Plasmazellen positiv. Variable Markierungen von Immunoblasten, epithelioiden Histiozyten, Sinus-Histiozyten sowie von Plasmazellen wurden beschrieben. Myeloide Zellen, Erythrozyten-Zellen, Megakaryozyten, Langerhans-Zellen in der Haut, im Epithel und im Bindegewebe werden vom Antikörper nicht markiert (2). B- und T-Zellen in Mandelgewebe weisen eine mäßige bis starke Färbereaktion auf, während die Mikrogliazellen in Hirngewebe eine schwache bis mäßige Färbereaktion aufweisen.

Pathologisches Gewebe: In Nicht-Hodgkin-Lymphomen wurden die neoplastischen Zellen vom Antikörper in 40 von 40 (100 %) der Fälle markiert (1). In einer anderen Studie lag die Zahl bei 74 von 80 (93 %). Eine dritte Studie (8) zeigte, dass 52 von 52 (100 %) niedriggradigen B-Zell-Lymphomen, 99 von 108 (92 %) hochgradigen B-Zell-Lymphomen und 41 von 44 (93 %) T-Zell-Lymphomen mit dem Antikörper positiv reagierten. Insgesamt reagierten mit dem Antikörper 162 von 162 (100 %) nicht-lymphoiden Neoplasmen negativ, darunter kleinzellig-anaplastische Karzinome, amelanotische Melanome, alveolare Rhabdomyosarkome, Ewing-Sarkome und Keimzellentumore (1, 2). Außerdem wurde die Markierung der Oberflächenmembran von Brustgangzellen in Proben von fibrozystischer Mastopathie und Fibroadenomen nachgewiesen. Diese Expression stellt jedoch kein differenzielles Diagnoseproblem dar, das zu einer Fehlidentifizierung führen könnte (9).

References/ Références/ Literatur

1. Warnke RA, Gatter KC, Falini B, Hildreth P, Woolston R-E, Pulford K, et al. Diagnosis of human lymphoma with monoclonal antileukocyte antibodies. N Engl J Med 1983;309:1275-81.
2. Kurtin PJ, Pinkus GS. Leukocyte common antigen - a diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies: Correlation with immunologic studies and ultrastructural localization. Hum Pathol 1985; 16:353-65
3. Michie SA, Spagnolo DV, Dunn KA, Warnke RA, Rouse RV. A panel approach to the evaluation of the sensitivity and specificity of antibodies for the diagnosis of routinely processed histologically undifferentiated human neoplasms. Am J Clin Pathol 1987; 88:457-62.
4. Sewell WA, Cooley MA, Hegen M. NL6. CD45 workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 499-502.
5. Saga Y, Furukawa K, Rogers P, Tung JS, Parker D, Boyse EA. Further data on the selective expression of Ly-5 isoforms. Immunogenetics; 1990:296-306.
6. Cobbold S, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, Beverley PCL, Cobbold S, Crumpton MJ, Gilks W, Gotch FM, et al., editors. Leukocyte typing III. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 3rd International Workshop and Conference; 1986 Sep 21-26; Oxford, England. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1987. p. 788-803.
7. Morimoto C. T18. CD45 cluster report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 386-9.
8. Hall PA, d'Ardenne AJ, Stansfeld AG. Paraffin section immunohistochemistry. I. Non-Hodgkin's lymphoma. Histopathol 1988; 13:149-60.
9. Herman GE and Elfont E. Aberrant CD45 (leukocyte common antigen) staining of non-malignant breast lesions in zinc formalin fixed tissue. J Histotechnol 1993; 16:151-3.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF Catalogue number Référence catalogue Bestellnummer	2 °C – 8 °C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	Use by Utiliser avant Verwendbar bis
IVD In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	Σ Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests	Manufacturer Fabricant Hersteller
Consult instructions for use Voir les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	LOT Batch code Numéro de lot Chargenbezeichnung	

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17